

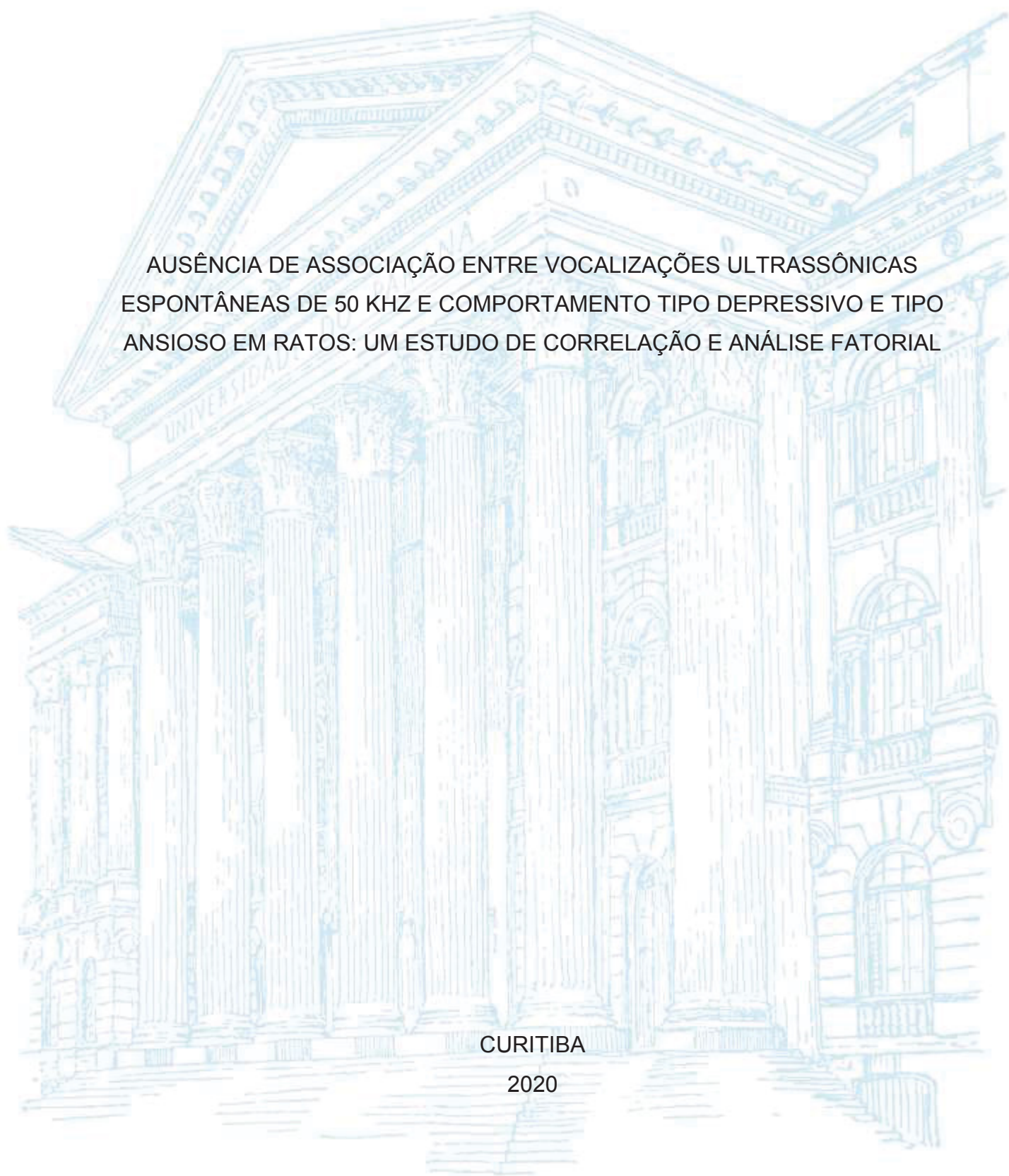
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARYANA ALBINO CLAVERO

AUSÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS  
ESPONTÂNEAS DE 50 KHZ E COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E TIPO  
ANSIOSO EM RATOS: UM ESTUDO DE CORRELAÇÃO E ANÁLISE FATORIAL

CURITIBA

2020



MARYANA ALBINO CLAVERO

AUSÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS  
ESPONTÂNEAS DE 50 KHZ E COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E TIPO  
ANSIOSO EM RATOS: UM ESTUDO DE CORRELAÇÃO E ANÁLISE FATORIAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Clavero, Maryana Albino

Ausência de associação entre vocalizações ultrassônicas espontâneas de 50 kHz e comportamento tipo depressivo e tipo ansioso em ratos: um estudo de correlação e análise fatorial. / Maryana Albino Clavero. – Curitiba, 2020.  
50 p.: il.

Orientador: Roberto Andreatini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Ansiedade 2. Depressão 3. Análise fatorial 4. Vocalização animal I. Título II. Andreatini, Roberto, 1961- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P9

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARYANA ALBINO CLAVERO** intitulada: **Ausência de associação entre vocalizações ultrassônicas espontâneas de 50 kHz e comportamento tipo depressivo e tipo ansioso em ratos: um estudo de correlação e análise fatorial**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2020.

CLAUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Àqueles que torceram  
por esta conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, obrigada por tornarem isso possível. Por muitas vezes abrirem mão dos próprios sonhos pelos meus, por priorizarem minhas vontades e apoiarem as minhas decisões. À minha mãe, principalmente, pelo exemplo de força, garra e por nunca me deixar desistir. À Isabella, pela amizade, companheirismo e cumplicidade. Obrigada por ouvir os meus desabafos, aguentar meus estresses e estar sempre presente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Andreatini, obrigada pela oportunidade de fazer parte desta equipe e por abrir as portas do laboratório. Obrigada pela paciência e apoio, pelo tempo dedicado, pelo profissionalismo e auxílio em minha formação, por aceitar a orientação deste trabalho e por acreditar tanto no meu potencial.

À Camila Pasquini por me acolher no laboratório, compartilhar o seu conhecimento, me ensinar muito sobre neuropsicofarmacologia, me ajudar com o delineamento do projeto e com as análises, sou extremamente grata.

Aos demais colegas de laboratório, o meu agradecimento por tornarem o tempo ali muito mais agradável, obrigada por essa experiência e pelo convívio. Agradeço pelas discussões, desabafos, ensinamentos e por me apoiarem tanto.

Aos professores da banca, obrigada pela discussão gerada e pelas sugestões de complementação do trabalho.

Aos professores do PPG em Farmacologia, agradeço ao incentivo, aos conhecimentos compartilhados, as trocas e discussões, as ideias e consolo.

À UFPR e ao PPG em Farmacologia, pela formação e contribuição com o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste trabalho, bem como, aos que compartilharam comigo esta fase os meus sinceros agradecimentos.

*“Conhecimento sem transformação não é sabedoria ”*

(Paulo Coelho)

## RESUMO

As vocalizações ultrassônicas (USVs) têm sido utilizadas como ferramenta para acessar estados afetivos em roedores. As vocalizações de 50 kHz estão associadas a um estado emocional positivo e podem ser induzidas por situações apetitivas e gratificantes, embora um ambiente com cepilho limpo também seja capaz de provocar esse tipo de chamada. Estudos tem mostrado diferenças individuais estáveis na vocalização de ratos, o que pode ser explicado por um componente genético ou sensibilidade à recompensa. Assim, as USVs podem ser consideradas um índice interessante para medir a resposta comportamental em diferentes contextos, como modelos de ansiedade e depressão. No presente estudo, três abordagens foram utilizadas para avaliar a associação entre USVs de 50 kHz e exploração (campo aberto), comportamento tipo-depressivo (teste de natação forçada e preferência por sacarose) e comportamentos tipo-ansioso (labirinto em cruz elevado): (a) análise de correlação; (b) comparação do perfil comportamental entre emissores altos e baixos de USVs de 50 kHz; (c) análise fatorial. Ratos Wistar adultos machos foram caracterizados como emissores altos (acima da mediana) ou baixos (abaixo da mediana) de acordo com o número de USVs de 50 kHz emitidos quando expostos a um ambiente com cepilho limpo. Não foram encontradas correlações significativas entre as USV espontâneas de 50 kHz e comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão. Além disso, comparando os resultados apresentados pelos emissores baixos e altos de USVs, não foram observadas diferenças comportamentais entre eles. Com relação à análise fatorial, foram encontrados quatro fatores (comportamento do tipo ansiedade, tipo-depressivo, exploração e tipo-antidepressivo), e as USVs mostraram relação apenas no fator envolvendo exploração. Assim, as USVs de 50 kHz não mostraram associação com comportamentos tipo-ansioso (labirinto em cruz elevado) e do tipo-depressivo (teste de natação forçada) em ratos Wistar machos. Estes resultados sugerem que USVs de 50 kHz nem sempre predizem comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão. Por outro lado, as USVs de 50 kHz não se correlacionaram com o teste de labirinto em cruz elevado e natação forçada, sugerindo que não se sobrepõe a essas variáveis e apoiando o uso das USVs como indicador de uma faceta diferente do comportamento emocional.

Palavras-chave: Vocalização ultrassônica. 50 kHz USV. Predição. Análise fatorial. Ansiedade. Depressão.



## **ABSTRACT**

Ultrasonic vocalizations (USVs) have been used as a tool to access affective states in rodents. Fifty kHz vocalizations are associated with positive emotional state and can be induced by appetitive and rewarding situations, although fresh bedding is also able to elicit this kind of calls. Studies have found stable individual differences in rat vocalization which could be explained by a genetic component or sensitivity to reward. Thus, USVs could be a stable and interesting index for measurement of behavioral response in different settings such as anxiety and depression models. In the current study, three approaches were used to evaluate the association between 50 kHz USV and exploration (open-field), depressive-like (forced swim test and sucrose preference) and anxiety-like behaviors (elevated plus-maze): (a) a correlational analysis; (b) comparison of the behavioral profile between high and low 50 kHz USV emitters; (c) factor analysis. Adult male Wistar rats were characterized as either high (above median) or low emitters (below median) according to the number of 50 kHz USVs elicited by fresh bedding. No significant correlation was found between the spontaneous 50 kHz USV and anxiety-like and depression-like behaviors. Moreover, comparing outcomes showed by low and high USVs emitters, no behavioral differences between them were observed. Concerning the factorial analysis, four factors were found (anxiety-like, depression-like, exploration and anti-depressive like behavior), and USVs have only loaded in the factor related to exploration. Thus, 50 kHz USV do not show association with anxiety-like (elevated plus-maze) and depression-like (forced swim test) behaviors in male Wistar rats. These results suggest that 50 kHz do not always predict anxiety-like and depressive-like behavior. On the other hand, 50 kHz USV did not load in the same factor of elevated plus maze and forced swimming test, suggesting that it not overlap with these variables and supporting the use of USV as an indicator of a different facet of emotional behavior.

**Keywords:** Ultrasonic vocalization. 50 kHz vocalization subtype. Prediction. Factor analysis. Anxiety. Depression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 – ESPECTOGRAMAS E SUBTIPOS DE USVS .....</b>	<b>17</b>
<b>FIGURA 2 – PRINCIPAIS VIAS DOPAMINÉRGICAS ENVOLVIDAS NA EMISSÃO DE USVS .....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 3 – LINHA DO TEMPO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 4 – DESFECHOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS COM ALTO E BAIXO ÍNDICE DE EMISSÃO DE USVS DE 50 KHZ BASAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 5 – LINHA DO TEMPO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DO PROJETO ENVOLVENDO A DOENÇA DE PARKINSON.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 6 – EFEITOS DO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM O INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 4 NOS TESTES COMPORTAMENTAIS EM RATOS.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 – FATORES OBTIDOS PELA ANÁLISE FATORIAL DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.....</b>	<b>36</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

6OHDA	– 6 hidroxidopamina
AF	– Análise fatorial
AFC	– Análise fatorial confirmatória
AFE	– Análise fatorial exploratória
AP	– Anteroposterior
BA	– Braços abertos
BF	– Braços fechados
CA	– Campo aberto
CEUA	– Comitê de Ética local para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório
CONCEA	– Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DV	– Dorsoventral
EPM	– Erro padrão da média
FDA	– Food and Drug Administration
FDEs	– Fosfodiesterases
FDE4	– Fosfodiesterase do tipo 4
FM	– Frequência modulada
LCE	– Labirinto em cruz elevado
ML	– Médio-lateral
PS	– Preferência à sacarose
SNC	– Substância negra parte compacta
USV	– Vocalização ultrassônica (do inglês <i>ultrasonic vocalization</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 O USO DE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS	15
1.2 TIPO DE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS	16
1.2.1 USVs de 22 kHz	16
1.2.2 USVs de 50 kHz	17
1.3 USVS COMO PREDITOR DE COMPORTAMENTO	20
1.4 TESTES / MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO	21
1.5 ANÁLISE FATORIAL	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>27</b>
4.1 ANIMAIS	27
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	28
4.3.1 Preferência à sacarose (PS)	28
4.3.2 Campo aberto (CA)	29
4.3.3 Vocalizações ultrassônicas (USVs): gravação e análise	29
4.3.4 Labirinto em cruz elevado (LCE)	30
4.3.5 Teste de Natação Forçada (TNF)	31
4.4 ANÁLISE DE DADOS	31
4.4.1 Análise de correlação	32
4.4.2 Alto vs. baixo índice de emissão de USVs de 50 kHz (medida basal)	32
4.4.3 Análise fatorial	32
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>34</b>
5.1 USV BASAL DE 50 KHZ COMO PREDITOR DE COMPORTAMENTO	34
5.1.1 Análise de correlação	34
5.1.2 Alto vs. baixo índice de emissão de USVs de 50 kHz (medida basal)	34
5.2 ANÁLISE FATORIAL	36
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>

<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O USO DE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

O interesse da pesquisa em comunicação vocal e social em ratos vem crescendo. Estes animais emitem e percebem vocalizações na faixa ultrassônica, inaudível aos ouvidos humanos (acima de 20 kHz) (WÖHR, 2018). Vocalizações ultrassônicas (USVs) são parte fundamental na vida social de ratos, facilitando a regulação dos estados internos relacionados à resposta a ameaças e ao contato afiliado entre os coespecíficos (WÖHR e SCHWARTING, 2013; BRUDZYNSKI, 2015). Isto tem implicações importantes para a pesquisa pré-clínica e ajuda a alcançar novas abordagens para a avaliação de estados e funções psicológicas em roedores.

Estudos etológicos mostram que a emissão de USVs inclui funções de localização e afiliação; função de manutenção de conexões entre os indivíduos do grupo; função emotiva (informando sobre o estado emocional do remetente e mobilizando os receptores – ouvintes – para a ação); bem como, função alarmante (alertando sobre perigo e promovendo defesa, fuga ou dispersão). A emissão de vocalizações desempenha um papel importante na formação de vínculos e cooperação social, assim como a manutenção de processos afiliativos (SIMOLA e BRUDZYNSKI, 2018).

Dentre as condições em que as USVs vem sendo utilizadas para a pesquisa pré-clínica, situações associadas a deficiências cognitivas e sociais com prejuízo na compreensão da comunicação emocional, como no caso da esquizofrenia, transtorno do espectro autista, mania, depressão, são relevantes. Além disso, este parâmetro pode ser incluso em estudos com doença de Parkinson, ansiedade, adição em drogas e sociabilidade (BRUDZYNSKI, 2013; 2018; SIMOLA e BRUDZYNSKI, 2018).

Devido ao fato de as USVs possivelmente transmitirem informações biologicamente significativas a outros indivíduos específicos, o seu registro e análise parece ser uma medida informativa em estudos neurocomportamentais. Portanto, sabe-se que, com base no tipo de vocalização, número e características acústicas, dois estados emocionais básicos podem ser identificados em ratos adultos: o negativo representado pelas USVs de 22 kHz; ou o positivo representado pelas de 50 kHz (BRUDZYNSKI, 2007; 2009; 2013).

## 1.2 TIPO DE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

### 1.2.1 USVs de 22 kHz

De maneira mais geral, as USVs de 22 kHz são produzidas em associação com estados emocionais negativos e situações aversivas (BRUDZYNSKI, 2013). Em termos de sua função social, elas têm sido consideradas como sinais de alarme porque são respostas defensivas a ameaças de predadores, facilitando a sobrevivência do grupo, assim como, sinalizando situações que podem representar um risco para a integridade física e social do organismo (LITVIN et al., 2007). Além disso, tais USVs são emitidas em situações que incluem medo condicionado ou ansiedade, exposição a odores, drogas ansiogênicas, abstinência de drogas aditivas (como álcool, benzodiazepínicos, opióides ou psicoestimulantes) e derrota social (BRUDZYNSKI, 2001; BURGDORF et al., 2008; SCHWARTING e WÖHR, 2012). A produção de USV de 22 kHz está positivamente correlacionada com outras medidas tradicionais de medo/ansiedade, como o comportamento de congelamento, assim como quando adicionados a um ambiente em que foram previamente expostos a um estímulo aversivo inevitável (por exemplo, um choque elétrico nas patas) (WÖHR e SCHWARTING, 2008).

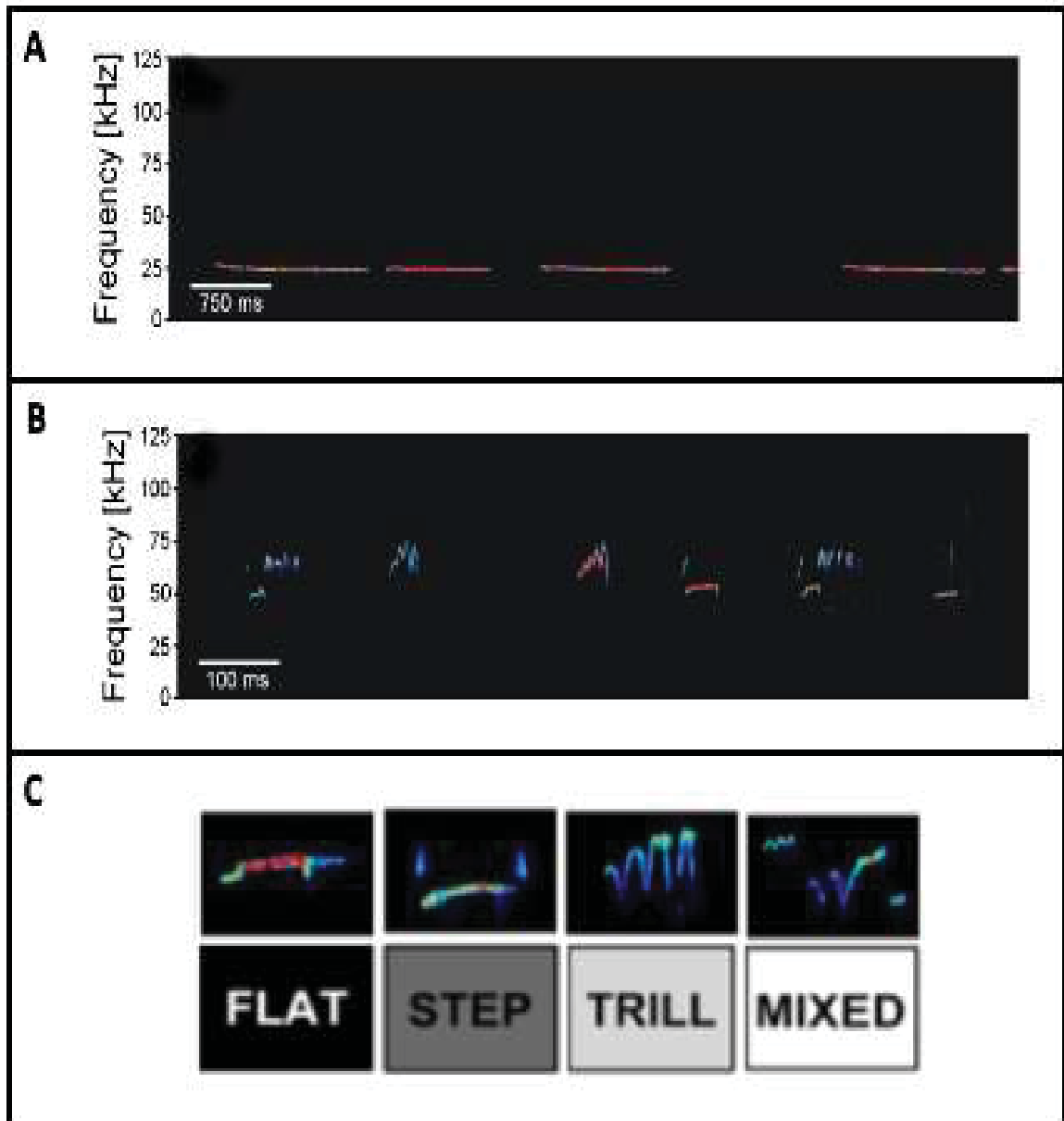
Estas USVs são iniciadas pela atividade do sistema colinérgico mesolímbico ascendente, que se origina no núcleo tegmental laterodorsal. Dois alvos principais dessas projeções colinérgicas são a área hipotalâmica-pré-óptica anterior e o septo lateral (BRUDZYNSKI, 2013). Farmacologicamente, elas podem ser obtidas com a injeção de carbacol, um agonista colinérgico não seletivo. E, em contrapartida, apresenta-se diminuída com a injeção de escopolamina, um antagonista colinérgico muscarínico. Ademais, USVs de 22 kHz podem ser obtidas pela injeção de glutamato no núcleo tegmental laterodorsal, um efeito que também pode ser diminuído pela escopolamina (BRUDZYNSKI, 2001; 2015). Estudos sugerem que neurônios colinérgicos são os mais ativos durante a emissão deste tipo de USVs (BRUDZYNSKI, et al., 2011), no entanto, evidências recentes sugerem que a serotonina também desempenha um papel modulador na emissão desses sinais (WÖHR et al., 2015).

Em relação a sua aparência, as USVs de 22 kHz têm uma frequência sonora mantida entre 20 e 35 kHz e uma longa duração de chamada, mas uma falta de modulação de frequência apreciável. No espectrograma (figura 1A), aparecem como



linhas planas retas com uma largura de banda estreita de 1 a 4 kHz (BRUDZYNSKI, 2014).

**FIGURA 1 – ESPECTOGRAMAS E SUBTIPOS DE USVS**



(A) Espectrogramas das USVs de 22 kHz; (B) espectrogramas das USVs de 50 kHz; (C) subtipos de USVs de 50 kHz. Fonte: Adaptado de Wöhr et al., 2013; 2015.

### 1.2.2 USVs de 50 kHz

Ratos emitem USVs de 50 kHz para comunicar estados de excitação e emoções positivas a indivíduos específicos, bem como para sinalizar situações

agradáveis e que podem aumentar ou consolidar a integridade física e social do organismo. Além disso, são emitidas desempenhando um papel no aumento da coesão e cooperação do grupo e coordenação do comportamento social (BRUDZYNSKI, 2013; BURGDORF et al., 2008; 2011). É proposto, que USVs de 50 kHz poderiam ser um homólogo evolutivo do riso humano (PANKSEPP, 2007).

Tais USVs podem ocorrer, por exemplo, durante ou em antecipação ao recebimento de alimentos e comportamento sexual. Assim como, em brincadeiras e em resposta a cócegas (BURGDORF et al., 2008). Outra situação em que são emitidas, é quando entram em lugares previamente visitados por outros ratos, o que indicaria a antecipação de contatos sociais amigáveis (BRUDZYNSKI e PNIAK, 2002). Várias drogas de abuso e psicoestimulantes, como anfetamina, cocaína, apomorfina e metilfenidato, mostraram aumentar a emissão destas USVs em ratos (BRUDZYNSKI, 2013).

Estudos que avaliaram os efeitos induzidos pela reprodução de USVs de 50 kHz demonstraram que ratos auto administram uma reprodução sonora de 50 kHz – representando uma situação prazerosa – e evitam as USVs de 22 kHz (WÖHR e SCHWARTING, 2007; BURGDORF et al., 2008). Existem ainda, outras evidências experimentais que mostram que USVs de 50 kHz não ocorrem necessariamente em situações apetitivas, uma vez que estas já foram detectadas quando ratos naives foram colocados na caixa de acrílico do teste contendo cepilho limpo (WÖHR et al., 2008).

As USVs de 50 kHz têm uma duração curta entre 30 e 40 ms, uma largura de banda de 5 a 7 kHz e uma frequência de 35 a 55 kHz, embora possam atingir até 70 kHz ou mais. Tais frequências são claramente distinguíveis das USVs de 22 kHz, tornando possível a discriminação entre elas e o reconhecimento do estado emocional do emissor (BRUDZYNSKI, 2018). Há ainda, uma subdivisão entre as USVs de 50 kHz com base em sua modulação de frequência sonora, em “*flat*” e frequência modulada (FM) e, aparentemente, elas apresentam funções sociais distintas (BURGDORF et al., 2008; WÖHR et al., 2008). USVs *flat* apresentam uma frequência que permanece praticamente inalterada durante sua emissão e são entendidas como um meio de coordenação social (WÖHR et al., 2008). Em contrapartida, as FM mostram mudanças substanciais em sua frequência e, são emitidas em situações altamente gratificantes e associadas a alta excitação emocional positiva (BURGDORF et al., 2008; 2011). Ainda, as FM são subdivididas com base na natureza de sua

modulação e na forma que eles assumem no espectrograma, aqui distinguidas como *step*, *trill* ou *mixed* (figura 1B e 1C). Há pesquisadores que as classificam em mais de 14 tipos diferentes, contudo seu significado biológico não é conhecido (WÖHR et al., 2008).

A emissão de USVs de 50 kHz é controlada pelo sistema dopaminérgico mesolímbico ascendente, cujos axônios se originam na área tegmental ventral e tem projeções para o núcleo accumbens, o núcleo septal e partes do córtex (figura 2). Este sistema está convencionalmente associado a motivação, reforço ou impulso. Injeções de anfetamina (agonista dopaminérgico) tanto no núcleo accumbens quanto no núcleo do septo lateral, foram particularmente eficazes na obtenção de USVs de 50 kHz (BRUDZYNSKI, 2015). Recentemente, foi demonstrado que USVs de 50 kHz causam uma liberação fásica de dopamina em ratos receptores (WILLUHN et al., 2014)

**FIGURA 2 – PRINCIPAIS VIAS DOPAMINÉRGICAS ENVOLVIDAS NA EMISSÃO DE USVS**

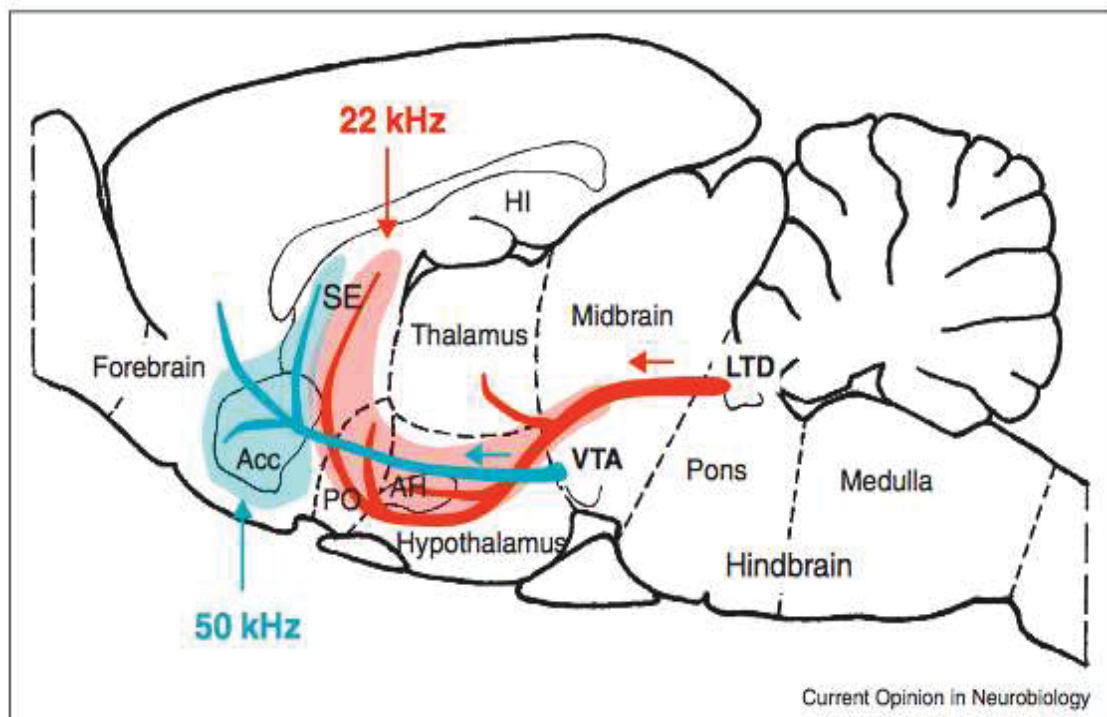


Ilustração das vias dopaminérgicas envolvidas na emissão de USVs: via colinérgica mesolímbica (vermelho) e via dopaminérgica mesolímbica (azul escuro). As setas ao longo dos caminhos indicam a direção da condução. Abreviações: ACC: núcleo accumbens; HA: área hipotalâmica anterior; HI: hipocampo; LDT: núcleo tegmental laterodorsal; PO: área pré-óptica; SE: septo; ATV: área tegmental ventral. Fonte: Brudzynski, 2013.

### 1.3 USVS COMO PREDITOR DE COMPORTAMENTO

Vários estudos encontraram diferenças individuais estáveis na vocalização de ratos em USVs espontâneos produzidos durante a exposição a um ambiente diferente e induzidos por drogas (SCHWARTING et al., 2007; AHRENS et al., 2013). Tais diferenças têm um componente genético e frequentemente parecem estar ligadas a características emocionais e sensibilidade à recompensa (SCHWARTING et al., 2007; BURGDORF et al., 2008). Como forma de melhor compreender estas diferenças, tem se tornado comum a classificação destes animais de acordo com seu índice de emissão de USVs. Assim, este parâmetro, parece ser um índice estável e interessante para mensuração de respostas comportamentais em diferentes contextos, como modelos de ansiedade e depressão.

Burgdorf e colaboradores têm estudado diferenças comportamentais em ratos que foram seletivamente classificados como altos ou baixos emissores de USVs de 50 kHz e segregados por algumas gerações. Eles observaram que ratos que apresentam altos níveis de USVs (quando induzidos por cócegas) são mais “divertidos” e preferidos como parceiros de brincadeiras, bem como exibem comportamentos lúdicos, e consideram a estimulação tátil mais gratificante e menos aversiva do que os animais selvagens. Estes animais mostram taxas elevadas de USVs de 50 kHz, associada a uma diminuição concomitante de USVs de 22 kHz, sugerindo que tais animais exibem uma maior tendência para afetividade positiva e uma menor para a negativa (BURGDORF et al., 2005; 2008).

De maneira semelhante, Rygula et al. (2012) treinaram ratos em um paradigma de condicionamento operante da seguinte maneira: i) pressionar uma alavanca em resposta a um tom para receber uma solução de sacarose; ii) pressionar outra alavanca quando um tom diferente foi apresentado para evitar punição pela administração de um choque. Após o treinamento, os ratos foram submetidos a cócegas e divididos em dois grupos de acordo com seu índice de emissão de USVs. Em seguida, os grupos foram expostos a um tom ambíguo e as medições foram feitas com relação à frequência com que os ratos pressionavam as alavancas. Desta forma, descobriram que ratos com alto índice de emissão de USVs de 50 kHz exibiam um viés “otimista” em relação à alavanca de recompensa de alimentos, uma vez que pressionaram com mais frequência quando expostos ao tom ambíguo.

Com isso, as USVs foram designadas como uma ferramenta poderosa em estudos pré-clínicos de afeto, motivação e comportamento social. Portanto, os dados das USVs de ratos podem prever o estado de um organismo e, assim, servir como um indicador confiável de seu estado geral (BRUDZYNSKI, 2009). Vários estudos demonstraram que altas taxas de vocalizações induzidas por isolamento durante a infância predizem a manifestação de fenótipos semelhantes à ansiedade e à depressão na idade adulta (ZIMMERBERG, et al., 2005; BRUNELLI et al., 2015). Wöhr e colaboradores (2008) relataram que ratos Wistar emitiram baixos números de USVs de 50 kHz quando testados nos testes de campo aberto ou labirinto em cruz elevado. Da mesma forma, outro estudo descobriu que o teste do labirinto em cruz elevado reduziu a emissão de USVs de 50 kHz (RAO e SADANANDA, 2015).

Além disso, ratos submetidos a um protocolo estressante exibiram alterações na emissão de USVs em resposta à administração de anfetaminas. Essas alterações podem estar associadas a anormalidades comportamentais, observadas como diminuição da preferência pela sacarose, aumento da imobilidade no teste de natação forçada ou aumento da preferência por braços fechados no labirinto em cruz elevado (KÖIV et al., 2016; VARES et al., 2018). Mais ainda, foi demonstrado que o número de USVs de 50 kHz emitidos em resposta a cócegas pode prever o comportamento dos ratos em testes utilizados para avaliar fenótipos ansiosos e depressivos (MÄLLO et al., 2007). Mällo e colegas (2009) observaram o desenvolvimento de vários sinais comportamentais de anedonia e afeto negativo em resposta ao estresse crônico, preferencialmente em ratos machos com baixa emissão de USVs de 50 kHz, sugerindo que um baixo afeto positivo pode ser um fator de risco para desenvolvimento de depressão. Assim, faz-se necessário a busca de variáveis preditivas para possivelmente acessar o desenvolvimento de fenótipos emocionais negativos.

#### 1.4 TESTES / MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Um modelo animal com relevância biológica faz uso de um organismo vivo para estudar as relações cérebro-comportamento sob condições controladas, com o objetivo final de obter informações e permitir previsões sobre essas relações em

humanos (VAN DER STAAY, 2006). Um critério importante para o desenvolvimento de modelos animais envolve o estabelecimento da validade do modelo como uma representação útil do processo em estudo. Geralmente, três tipos de parâmetros de validade são aplicados a modelos animais: validade de face, validade de construto e validade preditiva.

A validade da face, compreende um modelo fenotipicamente semelhante e implica que a resposta observada deva ser similar às respostas comportamentais e fisiológicas observadas em humanos. A preditiva, implica que o modelo deve ser sensível a agentes farmacológicos clinicamente eficazes e, ineficazes àqueles que não apresentam efeito na clínica. A validade de construto, por sua vez, refere-se à semelhança entre a lógica teórica do modelo animal e o comportamento humano. Idealmente, um modelo animal deve possuir validade de construto e preditiva, para que possa ser usado para entender os mecanismos e a etiologia dos fatores comportamentais e biológicos subjacentes ao distúrbio que podem ser semelhantes em animais e humanos (NESTLER e HYMAN, 2010; WANG et al., 2017).

É importante distinguir entre as características de um modelo e o teste realizado para obtenção de medidas. O labirinto em cruz elevado, o teste de preferência a sacarose e o teste do nado forçado, por exemplo não são modelos animais, e sim testes frequentemente utilizados em animais normais, porém úteis simultaneamente em avaliar leituras dos efeitos de manipulações experimentais (KUMAR et al., 2013).

O teste de natação forçada foi apresentado sob o conceito de desespero comportamental avaliando a estratégia de resposta de um animal a uma situação extremamente estressante e inevitável: se ele persiste em tentativas infrutíferas de escapar ou se adota uma estratégia passiva de esperar (PORSOLT et al., 1978; HOFFMAN, 2016). A latência para adotar a postura imóvel durante o teste, juntamente com o tempo total natação ou escalada, são medidas consideradas relevantes para o estado de depressão. Neste paradigma, a imobilidade é reduzida pelo tratamento antidepressivo agudo, apoiando seu uso como uma triagem rápida de compostos com possível atividade antidepressiva. Argumenta-se que uma das fraquezas desse teste é abordar um estresse de curto prazo aplicado a roedores normais, o que é diferente da depressão humana (HOFFMAN, 2016; HARRO, 2019). Em relação às validades, o teste possui uma forte validade preditiva, boa confiabilidade, alguma validade de face e baixa validade de construto (PETIT-DEMOULIERE et al., 2005).

O teste de preferência a sacarose é baseado na preferência natural do animal por doces, com o pressuposto de que essa preferência é proporcional ao prazer que o animal experimenta quando os consome. Ratos e camundongos preferem a água com sacarose sobre a água comum. Em geral, esse teste mede a preferência por uma solução de sabor doce em relação à água, avaliando o consumo das soluções pelo animal em um determinado período de tempo. A anedonia, um atributo clássico da depressão, pode ser caracterizada por uma perda de interesse em coisas que antes eram agradáveis. Neste teste, a anedonia é avaliada pela falta de interesse (preferência) na solução de sacarose (HOFFMAN, 2016; WANG et al., 2017; HARRO, 2019).

O labirinto em cruz elevado é um dos testes comportamentais mais populares para pesquisas sobre ansiedade. Baseia-se na aversão natural de roedores por espaços abertos e usa conflitos entre exploração e aversão a estes locais. A ansiedade é medida pela quantidade de tempo que o roedor passa nos braços fechados versus os braços abertos. Tipicamente, um roedor não ansioso irá explorar os braços abertos, enquanto um ansioso permanecerá completamente dentro dos braços fechados ou apenas espreitará do centro enquanto seu corpo estiver oculto dentro do braço fechado (PELLOW et al., 1985). Além disso, é sensível tanto a substâncias ansiolíticas quanto ansiogênicas (SCHMIDT e MULLER, 2006; WANG et al., 2017). Apresenta validade de face (observada, por exemplo quando os braços abertos são evitados e os roedores passam a maior parte do tempo nos braços fechados do labirinto, sendo considerado uma medida de ansiedade e medo), de constructo e preditiva (uma vez que drogas ansiolíticas utilizadas na clínica, apresentam o mesmo efeito no teste, e o mesmo ocorre com as ansiogênicas) (WALF e FRYE, 2007).

O teste de campo aberto, por sua vez, é um dos procedimentos mais utilizados em comportamento animal. Versões diferentes estão disponíveis, diferindo na forma do ambiente, iluminação, presença de objetos, etc. A proposta do teste é verificar os comportamentos desencadeados, colocando-se um animal em um espaço aberto, do qual a fuga é impedida por uma parede circundante elevada. Trata-se não apenas de uma medida da atividade motora, mas envolve fatores, como exploração e medo / ansiedade. Um roedor não ansioso irá explorar o centro do recinto mais do que um ansioso, que se movimenta junto às paredes ou simplesmente fica em um lugar como



um canto (WALSH e CUMMINS, 1976; PRUT e BELZUNG, 2003; GOULD et al., 2009; WANG et al., 2017).

## 1.5 ANÁLISE FATORIAL

A análise fatorial (AF) é um método que, essencialmente, produz a simplificação ordenada de várias medidas inter-relacionadas através de procedimentos matemáticos. O objetivo geral da AF é resumir os dados para que os relacionamentos e padrões possam ser facilmente interpretados e compreendidos. É normalmente usado para reagrupar variáveis, normalmente mensuradas em um mesmo indivíduo, em um conjunto limitado de grupos com base na variação compartilhada. Por isso, ajuda a isolar construções e conceitos (CHILD, 2006; YONG e PEARCE, 2013).

Os fatores não observáveis não são medidos diretamente, mas são construtos essencialmente hipotéticos usados para representar variáveis. No centro da AF está a correlação que mede a força e a direção do relacionamento entre duas variáveis. Este método é utilizado em muitos campos, como ciências sociais e comportamentais, medicina, economia e geografia, como resultado dos avanços tecnológicos de softwares (RODGERS e JHONSON, 1995; YONG e PEARCE, 2013).

Basicamente, as duas principais ferramentas da AF são a análise fatorial confirmatória (AFC) e a análise fatorial exploratória (AFE). Na AFE, o pesquisador não tem expectativas quanto ao número ou natureza das variáveis e, como o título sugere, é de natureza exploratória. Ou seja, permite ao pesquisador explorar as principais dimensões para gerar uma teoria ou modelo a partir de um conjunto relativamente grande de construções latentes, muitas vezes representadas por um conjunto de itens e o objetivo é encontrar o menor número de fatores comuns que responderão pelas correlações. Enquanto no AFC o pesquisador usa essa abordagem para testar uma teoria proposta, ou modelo e, em contraste com a AFE, tem premissas e expectativas baseadas na teoria a priori em relação ao número de fatores e a quais teorias ou modelos de fatores melhor se ajustam (CHILD, 2006; WILLIAMS et al., 2010; YONG e PEARCE, 2013).

Alguns conceitos são fundamentais para a execução e compreensão da AF. Considerando a configuração estabelecida para a realização da análise, é necessário optar por uma técnica de extração de fatores (as quais podem ser: componentes



principais, fatores principais, fatora  o por imagem, etc.), sendo o método de componentes principais o mais utilizado. O tipo de rota  o dos fatores, por sua vez, se refere ao método matemático que rotaciona os eixos no espaço geométrico. Com o seu uso, objetiva-se que o resultado empírico encontrado seja mais facilmente interpretável, conservando as propriedades estatísticas. O tipo de rota  o ortogonal Varimax    o mais frequentemente escolhido, uma vez que busca minimizar o número de variáveis que apresentam altas cargas em cada fator. Alguns métodos podem auxiliar o pesquisador na hora de decidir quantos fatores devem ser apontados na AF. O critério de Kaiser, por exemplo, sugere que devem ser extraídos apenas os fatores com valor de *eigenvalue* acima de um, por representar uma boa contribui  o do fator na explica  o das varia  o  es das variáveis originais (FIGUEIREDO FILHO E SILVA JÚNIOR, 2010). Por fim, os valores da carga (ou carregamento – *loading factors*) representam o quanto a variável original se correlaciona com o fator gerado pela análise.

## 2 JUSTIFICATIVA

As vocalizações ultrassônicas vem sendo amplamente utilizadas para estudar diversos aspectos comportamentais, motivacionais e psicológicos dos animais em pesquisas pré-clínicas. Por se tratar de um índice estável e individual, elas podem ser um fator fundamental para se avaliar fenótipos de ansiedade e depressão. Portanto, se faz necessário o seu uso e avaliação através de ferramentas matemáticas para verificar o seu papel em análises comportamentais.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel das vocalizações ultrassônicas espontâneas de 50 kHz como preditoras de comportamento animal em modelos de ansiedade e depressão.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a existência de correlação entre vocalizações ultrassônicas espontâneas de 50 kHz com comportamentos observados ao longo do tempo nos testes de preferência à sacarose e campo aberto, assim como nos testes do labirinto em cruz elevado e nado forçado.
- Comparar os comportamentos tipo-ansioso (labirinto em cruz elevado), tipo-depressivo (teste de natação forçada e preferência à sacarose) e exploratória (campo aberto) de ratos com alta e baixa emissão de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz.
- Verificar se as vocalizações se agrupam, através da análise fatorial, com outras medidas comportamentais em modelos animais de ansiedade e depressão.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo sessenta e um ratos Wistar macho (com aproximadamente 3 meses de idade e pesando entre 280 a 320 g). Os animais foram mantidos em grupos de cinco em caixas moradia de policarbonato (60 x 25 x 25 cm), em um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h00 da manhã), com temperatura ambiente controlada de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ . Comida e água disponíveis *ad libitum*. Os animais foram habituados nessas condições, pelo menos, uma semana antes do início da experimentação. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética local para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (nº 1219), em conformidade com o Guia do National Institutes of Health para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e a legislação brasileira seguindo as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

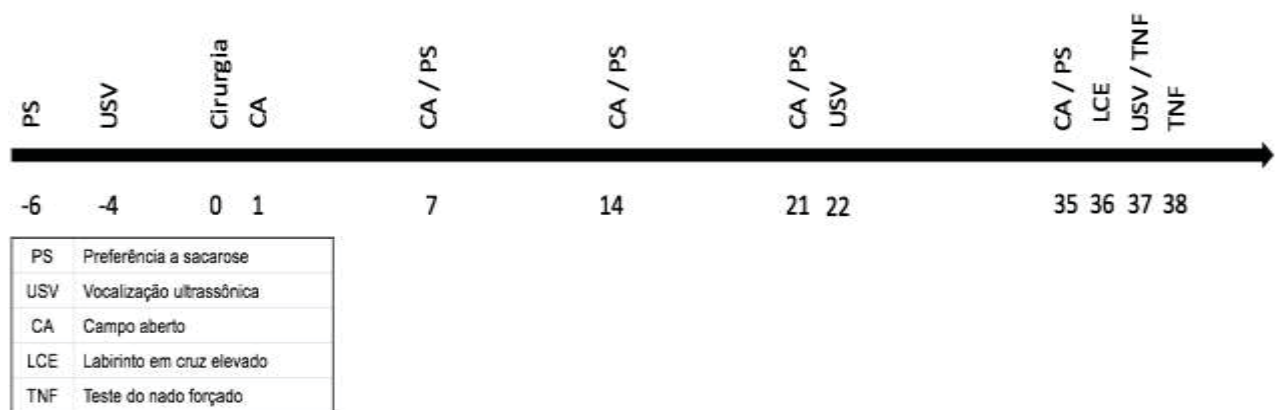
### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados deste trabalho são advindos de um projeto onde os animais foram submetidos a cirurgia estereotóxica com infusão da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6OHDA) na substância negra parte compacta (SNc). Contudo, ao realizar-se a análise estatística, nenhum efeito foi detectado tanto pela cirurgia quanto pelo tratamento com o roflumilaste, um inibidor da fosfodiesterase do tipo 4 (mais informações disponíveis no apêndice I). Diante disso, todos os animais foram considerados para o presente estudo.

Primeiramente, os animais passaram por uma análise de sua preferência à sacarose basal para randomização dos grupos, assim como por um teste *screening* de vocalização ultrassônica, com a finalidade de se avaliar a emissão espontânea destes animais. Com a média dos dados obtidos durante os dois dias de *screening* das USVs espontâneas, os animais tiveram suas medidas basais avaliadas. Em seguida, realizou-se a cirurgia estereotóxica – considerada dia zero – e, os seguintes testes comportamentais foram realizados: campo-aberto (CA) (nos dias 1, 7, 14, 21 e

35), preferência à sacarose (PS) (nos dias 7, 14, 21 e 35), USVs (nos dias 22 e 37), labirinto em cruz elevado (LCE) (no dia 36) e teste do nado forçado (TNF) (com o pré-teste no dia 37 e o teste no 38), conforme mostrado na figura 2. O procedimento cirúrgico assim como as drogas utilizadas encontram-se descritos no apêndice deste trabalho.

**FIGURA 3 – LINHA DO TEMPO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**



Fonte: o autor (2020).

### 4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes foram realizados no período matutino (08h00 às 13h00), conforme descritos a seguir.

#### 4.3.1 Preferência à sacarose (PS)

A PS é geralmente utilizada como ferramenta para avaliar a indução de anedonia em roedores submetidos a modelos de depressão. O teste foi realizado da seguinte maneira: primeiramente ocorreu uma fase de adaptação com duração de 24 horas, na qual os animais foram isolados em caixas individuais com livre acesso a alimentos e duas garrafas contendo água. Após esse período, uma das garrafas teve seu conteúdo substituído por uma solução de sacarose a 1%, e os animais puderam optar por consumir conteúdo de ambas soluções por um período também de 24 horas. A quantidade de líquido consumido foi calculada pelo peso inicial menos o peso final

das garrafas e, portanto, a preferência foi determinada como a porcentagem do volume de ingestão de sacarose sobre o volume total de ingestão de líquidos.

Uma avaliação basal foi realizada antes da cirurgia e apenas os ratos que apresentaram PS acima de 70% foram mantidos no experimento. Assim, o teste foi repetido semanalmente nos dias 7, 14, 21 e 35 após a cirurgia. Após o teste, todos os animais retornaram à sua caixa moradia com livre acesso a comida e água.

#### 4.3.2 Campo aberto (CA)

O CA foi realizado com o objetivo de se avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais (WALSH e CUMMINS, 1976). Este aparato consiste em uma arena circular (1 m de diâmetro x 32,5 cm), onde os animais são colocados individualmente no centro e a distância percorrida por ele – medida de atividade locomotora – foi avaliada por um período de 5 minutos. O teste foi gravado em vídeo e avaliado pelo software ANY-maze (versão 6.13, Stoelting Co., EUA). Este teste foi repetido semanalmente após a cirurgia.

#### 4.3.3 Vocalizações ultrassônicas (USVs): gravação e análise

USVs de diferentes tipos são uma das formas de comunicação entre roedores. Para capturar tais USVs, foi utilizado um microfone condensador UltraSoundGate CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) posicionado 45 cm acima do centro da caixa onde o animal foi testado, para obtenção de uma melhor captura acústica. Este microfone é sensível a frequências entre 15 – 180 kHz e, portanto, abrange a frequência de interesse para a avaliação das USVs. Os dados acústicos foram gravados usando o Avisoft Recorder (versão 2.95, Avisoft Bioacoustics).

Devido à grande variabilidade interindividual na emissão de USVs de 50 kHz, uma triagem, definida como duas sessões de cinco minutos em dois dias consecutivos, foi realizada antes da cirurgia. A média de USVs emitida por cada animal foi utilizada para classificá-los em dois grupos: alto (acima da mediana) e baixo (abaixo da mediana; ver item 4.4.2) número de emissão de USVs de 50 kHz. O teste foi realizado colocando-se o animal em uma caixa de acrílico transparente de 40 x 40 x 40 cm, forrada com cepilho limpo, sob 4 lux de luminosidade, durante cinco minutos. Ainda, a cada troca de animal, cepilho novo era adicionado ao aparato. Nos dias 22 e

36 após a cirurgia, o mesmo procedimento foi repetido, contudo, desta vez realizado em sessão única.

Para análise das USVs as gravações de áudio armazenadas como arquivo .WAV foram transferidas para um sistema baseado em *deep-learning* chamado DeepSqueak (COFFEY et al., 2019). Tal software, divide os arquivos de áudio em fragmentos e converte-os em sonograma, para que então as imagens geradas passem por um detector de objetos (rede neural convolucional regional). As detecções foram posteriormente analisadas com uma rede de *denoiser post-hoc* treinada pelo experimentador. Com isso, foi possível detectar automaticamente e distinguir USVs de ruídos (que comumente estão presentes neste tipo de arquivo). Finalmente, as USVs detectadas foram agrupadas manualmente em subtipos utilizando parâmetros de classificação relatados anteriormente (PEREIRA et al., 2014; WENDLER et al., 2019).

Com base em sua frequência, as USVs podem ser classificadas como aversivas (22 kHz – todas as vocalizações na faixa de 10 a 33 kHz) ou apetitivas (50 kHz – todas as vocalizações acima de 33 kHz). Desta maneira, de acordo com a forma exibida no sonograma, as USVs de 50 kHz foram classificadas em planas (*flat*) ou FM. Uma vocalização foi classificada como *flat* quando as variações de sua frequência de pico foi igual ou inferior a 5 kHz. As denominadas de FM, representadas na figura 3, foram subdivididas em *trill* (um elemento com uma ou mais alterações de frequência como picos superiores a 5 kHz ou com duas ou mais alterações de frequência de pico em direções opostas com pelo menos 5 kHz de distância), *step* (quando uma vocalização simples apresentou pelo menos um elemento plano curto adjacente ao início ou ao final; sendo que um desses elementos deve ser 5 kHz maior que o principal) e *mixed* (aquelas que não se encaixam nas demais categorias) (PEREIRA et al., 2014; WÖHR et al., 2015; WENDLER et al., 2019).

#### 4.3.4 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Este teste é usado para estudar o comportamento tipo-ansioso em ratos (WALF e FRYE, 2007). O aparato onde o teste é realizado consiste em dois braços abertos (BA) e dois fechados (BF) (50 cm de comprimento, 10 cm de largura e, no caso dos fechados parede com 40 cm de altura). Os braços são cruzados perpendicularmente um ao outro e permanecem elevados a 50 cm do chão. Além

disso, para evitar possíveis quedas do animal, os braços abertos têm uma pequena borda de 1 cm de altura. Para realizar o teste (no dia 36), o animal foi posicionado no centro dos braços, de frente para um braço aberto, onde pôde explorar livremente o aparelho por 5 minutos (sob 40 lux de luminosidade). O teste também foi gravado e o tempo gasto em cada braço foi avaliado usando o software ANY-maze (versão 6.13, Stoelting Co., EUA), enquanto o número de entradas nos BA e BF foram obtidos manualmente. Posteriormente, foram calculadas as porcentagens de tempo e de entradas nos BA (valor observado  $\times$  100 / valor total).

#### 4.3.5 Teste de Natação Forçada (TNF)

Este teste teve como objetivo avaliar o comportamento tipo-depressivo em animais. Este modelo foi proposto por Porsolt et al. (1977) e modificado por Lucki (1997). Os ratos foram colocados em um cilindro de plástico opaco (20 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com 30 cm de água a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Primeiro, os animais foram submetidos a uma sessão treino, onde permaneceram por 15 minutos. Após 24 horas, o teste foi realizado e o vídeo gravado por 5 minutos. Para a análise desses resultados, foi medido manualmente o tempo gasto, ao longo da sessão teste, em cada um dos seguintes comportamentos: imobilidade (movimentos suficientes para manter-se com a cabeça acima da superfície da água); natação (movimentos normalmente horizontais, por todo o cilindro); e escalada (movimentos verticais vigorosos das patas dianteiras acima da superfície da água ou contra as paredes do cilindro).

#### 4.4 ANÁLISE DE DADOS

Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão (EPM). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0.05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Enquanto o GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Prism, USA) foi utilizado para construção gráfica.

#### 4.4.1 Análise de correlação

O índice de correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizado para avaliar a correlação entre as USVs de 50 kHz basais e a atividade locomotora/exploratória (distância percorrida no CA e o número de entradas nos BF no LCE), comportamento tipo-ansioso (% de tempo gasto e % de entradas nos BA no LCE), e comportamento tipo-depressivo (duração da imobilidade, natação e escalada no TNF).

#### 4.4.2 Alto vs. baixo índice de emissão de USVs de 50 kHz (medida basal)

A amostra inteira foi classificada de acordo com o índice basal de emissão de USVs de 50 kHz em altos e baixos emissores, utilizando-se da mediana. Logo, os que emitiram abaixo da mediana foram denominados baixo emissores, enquanto os acima deste valor, designados alto emissores. Em seguida, estes grupos tiveram seus comportamentos comparados entre si no CA, no LCE, na PS e no TNF empregando o teste  $t$  de *Student* para grupos independentes.

#### 4.4.3 Análise fatorial

A análise fatorial dos componentes principais com rotação ortogonal (normalizada via varimax) da matriz fatorial foi realizada para variáveis medidas nos dias finais (dias 35 a 38) nos testes de USV (quantidade total de USVs de 50 kHz), no LCE (% de entradas e % de tempo nos BA e entradas totais nos braços), no TNF (tempo de imobilidade, natação e escalada) e no CA (distância percorrida).

As relações entre as variáveis são levadas em consideração e fatores independentes são formados considerando a variação nos dados. O número de fatores que respondem por um conjunto de dados específico é determinado *post-hoc* pela proximidade das inter-relações. Para essas análises, foram incluídos apenas os fatores com autovalores (*eigenvalues*) maiores que 1.

Para cada fator, um carregamento variável (*loading fator*) igual a 1 indica uma correlação perfeita da variável com o fator. Valores de carregamento entre 0,60 – 0,80 indicam uma forte correlação, enquanto valores de carregamento entre 0,40 – 0,60 indicam uma correlação moderada. Por fim, valores inferiores a 0,40 representam uma correlação fraca. Ainda, valores positivos indicam uma relação direta entre a variável



e o significado comportamental do fator, enquanto um valor negativo indica que a variável está inversamente correlacionada com o significado do fator. Dependendo de como uma medida específica está relacionada a outras, ela pode ter um valor de carregamento elevado em mais de um fator. Diante disso, somente foram relatados valores de carregamento maiores que 0,40, bem como apenas dados de animais nos quais pudemos acessar dados comportamentais para todas as variáveis foram considerados nesta análise.

## 5 RESULTADOS

A análise estatística foi realizada considerando ambas situações: todos os animais; e somente os animais pertencentes ao grupo SHAM + VEI do projeto inicial. Não foram encontradas diferenças entre os resultados. Por isso, devido ao fato de a análise fatorial requerer um maior número amostral, optamos por apresentar os dados envolvendo todos os animais.

### 5.1 USV BASAL DE 50 KHZ COMO PREDITOR DE COMPORTAMENTO

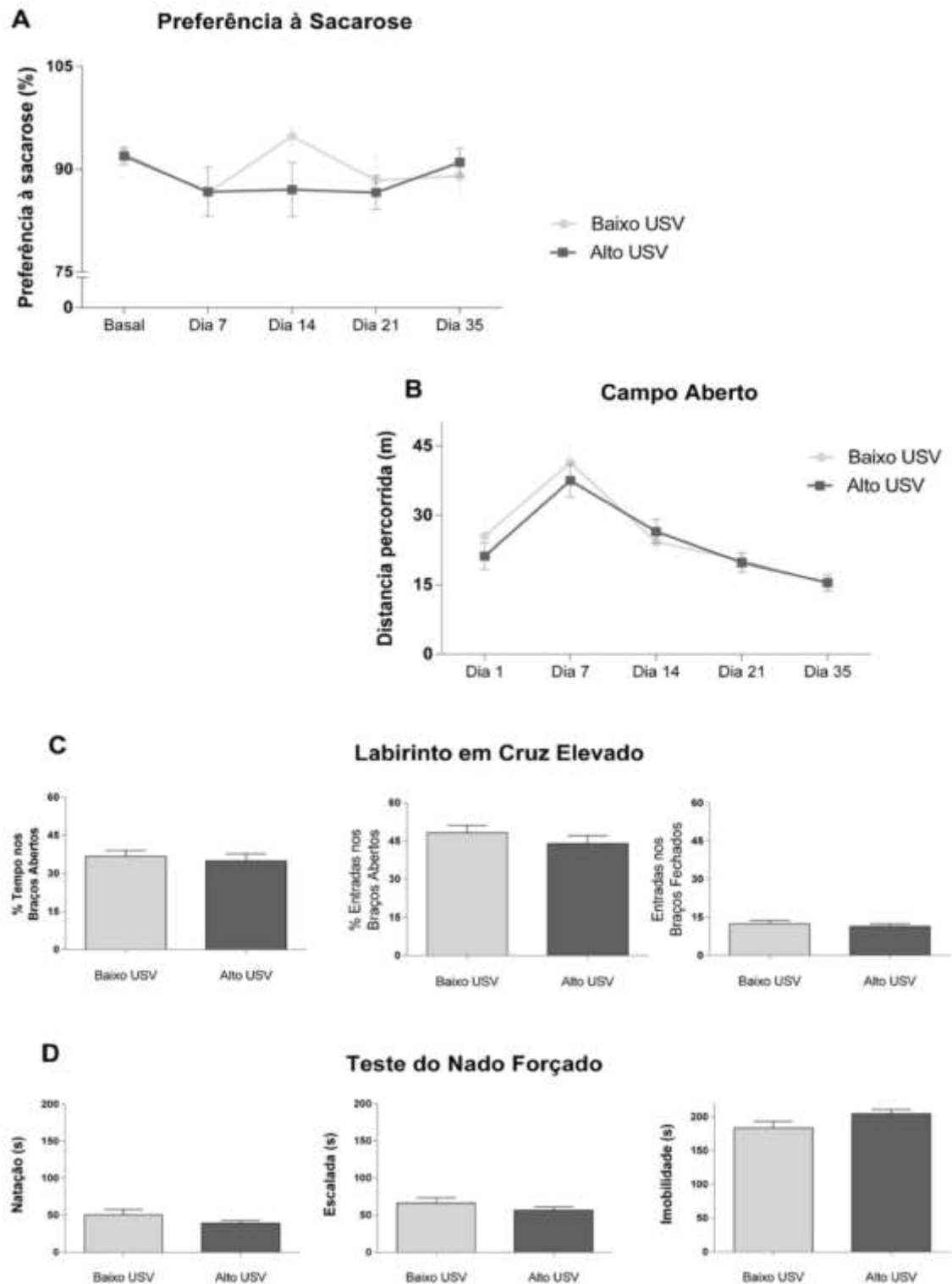
#### 5.1.1 Análise de correlação

USVs de 50 kHz basais não foram significativamente correlacionadas (todos  $p > 0,05$ ) com a PS do dia 35 ( $r = -0,07$ ), com a distância percorrida no CA no dia 35 ( $r = 0,11$ ), com os comportamentos observados no LCE no dia 36 (% de tempo gasto nos BA:  $r = 0,13$ ; % entradas nos BA:  $r = 0,20$ ; número de entradas nos BF:  $r = 0,01$ ), assim como com os comportamentos no TNF no dia 38 (imobilidade:  $r = 0,18$ ; natação:  $r = -0,14$ ; e escalada:  $r = -0,12$ ).

#### 5.1.2 Alto vs. baixo índice de emissão de USVs de 50 kHz (medida basal)

O número médio basal de USVs de 50 kHz foi de 99. Portanto, ratos que emitiram menos de 99 foram classificados como emissores baixos ( $n = 28-32$ ); e ratos que emitiram 99 ou mais foram denominados como emissores altos ( $n = 31$ ). Comparando tais grupos, não houve diferença significativa na PS (basal:  $t_{61} = -0,236$ , NS; dia 7:  $t_{61} = 0,036$ , NS; dia 14:  $t_{56} = -1,878$ , NS; dia 21:  $t_{61} = -0,406$ , NS; e dia 35:  $t_{59} = -0,559$ , NS), na distância percorrida no CA (dia 1:  $t_{61} = -0,920$ , NS; dia 7:  $t_{61} = -0,752$ , NS; dia 14:  $t_{61} = 0,669$ , NS; dia 21:  $t_{61} = -0,162$ , NS; e dia 35:  $t_{61} = 0,110$ , NS), nos comportamentos observados no LCE (% de entradas nos BA:  $t_{61} = -1,040$ , NS; % de tempo nos BA:  $t_{61} = -0,486$ , NS; e número de entradas de BF:  $t_{61} = -0,580$ , NS) e durante o TNF (imobilidade:  $t_{60} = 1,811$ , NS; natação:  $t_{60} = -1,476$ , NS; e escalada:  $t_{61} = -1,079$ , NS) como mostrado na figura 4.

**FIGURA 4 – DESFECHOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS COM ALTO E BAIXO ÍNDICE DE EMISSÃO DE USVS DE 50 KHZ BASAIS**



(A) Preferência à Sacarose (%) foi medida semanalmente depois da cirurgia (n= B: 28-32; A: 30-31). (B) Distância percorrida (m) no teste de CA avaliado semanalmente (n= B: 32; A: 31). (C) % entradas nos BA, % tempo nos BA e número de entradas nos BF no LCE no 36º dia após a (n= B: 32; A: 31). (D) Tempo em segundos nadando, escalando ou em imobilidade no TNF no 38º dia depois da cirurgia (n= B: 31; A: 31). Dados estão expressos como média  $\pm$  EPM em A e B, e média + EPM em C e D. Teste t de Student para grupos independentes foi utilizado.

## 5.2 ANÁLISE FATORIAL

A análise fatorial das 8 medidas comportamentais analisadas entre os dias experimentais 35 a 38, resultou em 4 fatores com autovalores acima de 1, responsáveis por 78,3% da variância total, cada fator compreendendo um conjunto de medidas comportamentais relacionadas (conforme resumido na tabela 1). O fator 1 incluiu apenas variáveis advindas do LCE: % de tempo e entradas nos BA (carga positiva) e número de entradas no BF (carga negativa). O fator 2 compreende comportamento de imobilidade (carga positiva) e escalada (carga negativa) no TNF. O fator 3 incluiu a distância percorrida no CA e o número de USVs de 50 kHz (carregado positivamente); e, a PS (carregado negativamente). Finalmente, o fator 4 incluiu comportamentos de natação (carga positiva) e imobilidade (carga negativa) no TNF.

**TABELA 1 – FATORES OBTIDOS PELA ANÁLISE FATORIAL DAS VARIÁVEIS ANALISADAS**

		<b>Fator 1</b>	<b>Fator 2</b>	<b>Fator 3</b>	<b>Fator 4</b>
	<b>Dia</b>				
Preferência à sacarose	35			- 0.42	
Distância percorrida	35			0.85	
% tempo nos BA	36	0.92			
% entradas nos BA	36	0.93			
Número de entradas nos BF	36	- 0.83			
Imobilidade	38		0.70		- 0.71
Escalada	38		- 0.96		
Natação	38				0.97
Total USV	37			0.74	
<b>Autovalores</b>		<b>2.658</b>	<b>2.044</b>	<b>1.3084</b>	<b>1.0483</b>
<b>% variância</b>		<b>29.5</b>	<b>22.7</b>	<b>14.5</b>	<b>11.6</b>

Somente valores de carregamento superiores a 0.4 estão representados (n= 50).

## 6 DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi avaliar a associação entre a emissão vocalizações ultrassônicas espontâneas de 50 kHz e comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em ratos Wistar. No entanto, não encontramos uma correlação entre as variáveis avaliadas. Além disso, comparando os resultados apresentados pelos animais com altos e baixos índices de emissão de USVs de 50 kHz no campo aberto, no teste de preferência à sacarose, no teste do labirinto em cruz elevado e no teste da natação forçada, também não foram encontradas diferenças comportamentais entre eles. Quanto à análise fatorial, foram encontrados quatro fatores, que juntos explicaram cerca de 78% da variância avaliada. Contudo, as USVs fizeram-se presentes apenas no fator 3, relacionando-as a preferência à sacarose e ao campo aberto.

Devido às grandes diferenças individuais na emissão de vocalização espontânea dos ratos, dividi-los de acordo com o nível de emissão basal de USVs de 50 kHz seria uma boa maneira de aprimorar a análise comportamental e avaliação de dados. Evidências indicam que as diferenças individuais nas USVs de 50 kHz são mapeadas para um fenótipo afetivo positivo de característica única, adicionado a níveis mais baixos de afeto negativo (SCHWARTING et al., 2007; WÖHR et al., 2008). Diferentemente dos resultados obtidos por nós, Engelhardt e colaboradores (2017) foram capazes de encontrar diferenças comportamentais entre altos e baixos emissores de USVs de 50 kHz. Eles demonstraram que ratos que emitem altas taxas espontâneas de USVs de 50 kHz, exibiram respostas mais intensas na emissão de USVs após a administração de anfetamina. Além disso, Mallo e colegas (2007) observaram que ratos com alto ou baixo índice de emissão de USVs em resposta a cócegas desde a adolescência apresentam diferenças na reatividade à novidade, com ratos com alta emissão apresentando maior tendência a reatividade emocional (por exemplo, ratos com alta emissão apresentam maior imobilidade no teste de natação forçada).

O teste para detecção da emissão basal de USVs pode ser realizado de diversas maneiras, por isso, é difícil estabelecer um valor único de USVs emitidas num determinado período de tempo para designar os animais como baixos e altos emissores de USVs de 50 kHz. Em condições semelhantes as empregadas neste estudo, porém com um número amostral menor (8 animais por grupo), Engelhardt e

colaboradores (2017) analisaram a emissão de USVs espontâneas no campo aberto. Desta forma, classificaram animais como baixos emissores aqueles que quase não apresentaram USVs no período analisado, e como altos emissores, aqueles que apesar de emitirem poucas USVs ao longo do tempo, vocalizaram quantidades superiores a 15 USVs nos dez primeiros minutos do teste. No estudo de Ahrens e colegas (2013), as USVs produzidas no intervalo pré-anfetamina (10 minutos) foram designadas como valores basais e comparadas com as emissões pós tratamento com anfetamina. Como critério de classificação, os animais designados com alta emissão, ao receberem anfetamina apresentaram quantidade superior a 50 USVs ou quintuplicaram o valor basal, por outro lado, os que não atenderam a estes critérios foram classificados como baixos emissores. Mallo e colaboradores (2007, 2009) utilizaram cócegas como o indutor de USVs e, assim como nós, utilizaram a mediana para classificar os animais em alto e baixos emissores. Em seus estudos, podemos observar que os animais classificados como baixos emissores emitiram quantidades inferiores a 75 USVs no período analisado, enquanto os classificados como alto emissores, vocalizaram quantidade superior.

No estudo de Burgdorf (2005), os animais foram acasalados entre si, de acordo com seus níveis de vocalização. Pode-se perceber que a distinção entre os grupos de altos e baixos emissores de USVs foi aumentando ao longo das gerações. Estes animais foram submetidos a dois minutos de cócegas enquanto eram testados e, animais classificados como baixos emissores exibiram em torno de 150 USVs enquanto os altos emissores 200 USVs na primeira geração. Curiosamente, na quarta geração, pode-se observar que os animais com baixa emissão continuaram apresentando em média 150 USVs enquanto os altos emissores mostraram aproximadamente 400 USVs de 50 kHz. Adicionalmente, este efeito se tornou mais pronunciado entre as gerações. A partir da sexta geração a emissão basal de animais com baixa emissão se tornou inferior a 100 USVs e permaneceu reduzindo ao longo de 14 gerações de criação seletiva (BURGDORF et al., 2008).

Em relação a análise fatorial, o primeiro fator incluiu % de tempo nos braços abertos, % de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados. Isso explica 29,5% da variância e pode ser considerado relacionado ao comportamento tipo-ansioso. O fato de duas variáveis estarem carregadas positivamente nesse fator é totalmente consistente com essa interpretação. Rodgers e Jhonson (1995) avaliaram medidas espaço-temporais e etológicas no EPM através

da análise fatorial e, usando parâmetros de análise tradicionais, eles basicamente encontraram dois fatores principais: comportamento tipo-ansiedade e atividade locomotora. Da mesma forma, Radhakrishnan e Gulia (2018) mostraram que estes componentes encontrados por nós no fator 1, pertencem a um grupo de medidas de ansiedade. Entretanto, o parâmetro denominado como número de entradas nos braços fechados, carregado aqui negativamente, é apontado como um índice de atividade de locomoção por alguns autores (CRUZ et al., 1994; RODGERS e JHONSON, 1995; DOREMUS et al., 2006). Para Hoog (1996), a interpretação dos dados obtidos nos estudos de EPM pressupõe que as variáveis mencionadas e discutidas possam afetar a sensibilidade farmacológica, mas não alteram o tipo ou componente de ansiedade. Seu estudo mostrou que seis diferentes artigos de análise fatorial (com condições experimentais, espécies e linhagens variáveis) descobriram que a % de entradas nos BA no e % de tempo nos BA carregam muito alto juntos e em um fator diferente do número de entradas nos BF. Afirmou ainda que a distribuição das cargas fatoriais de comportamentos mais complexos pode ser afetada pela adição de bordas ao EPM, alterando o componente da ansiedade medido.

O fator 2, assim como o fator 4, estão associados ao comportamento semelhante à depressão. Eles, respectivamente, explicam 22,7% e 11,6%, da variância da medida e incluem medidas de imobilidade e escalada para o fator 2; enquanto de imobilidade e natação para o fator 4. Embora os dois fatores estejam relacionados ao comportamento tipo-depressivo, eles sugerem ideias distintas: o fator 2 indica um comportamento relacionado ao polo depressivo, uma vez que a imobilidade apresenta um valor de carregamento positivo e de escalada negativo; enquanto o fator 4 revela um comportamento relacionado a um efeito tipo-antidepressivo, devido a um forte valor de carga positivo na natação e negativo na imobilidade. A imobilidade é interpretada como um índice de desespero comportamental ou como um desenvolvimento de comportamento passivo que desencadeia no animal formas ativas de lidar com estímulos estressantes (LINO DE OLIVEIRA et al., 2005). Os medicamentos antidepressivos, por exemplo, são capazes de reduzir o tempo gasto neste comportamento, modelo que apresenta uma boa validade preditiva. Em contraste, o comportamento da escalada está relacionado à fuga, portanto, inversamente correlacionado com a imobilidade. Considerando o fator 4, podemos observar que o comportamento de natação se apresentou fortemente carregado positivamente, indicando um possível comportamento antidepressivo. Este

aumento da natação (e a diminuição da imobilidade, sem afetar a escalada) pode ser igualmente observado quando administrados fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como por exemplo, a fluoxetina, a paroxetina e a sertralina. Por outro lado, uma redução da imobilidade associada a um aumento da escalada estaria associado à antidepressivos inibidores da receptação de noradrenalina e/ou dopamina (CRYAN et al., 2002).

Finalmente, o terceiro fator compreendeu dados do teste de preferência à sacarose, vocalizações ultrassônicas e campo aberto, correspondendo a 14,5% da variância. Observados em conjunto, estes resultados podem ser explicados pelo comportamento exploratório dos ratos. O fator mais forte aqui, carregado positivamente, é a distância percorrida no campo aberto. Em roedores, a ansiedade e a habituação comportamental são frequentemente analisadas em termos de comportamento exploratório, especialmente durante a exposição ao campo aberto, o que leva a uma atividade comportamental pronunciada, quando o ambiente é novidade, e diminuída, quando familiar (THIEL et al., 1998). Curiosamente, a outra característica carregada positivamente neste fator é a emissão de USVs. USVs de alta frequência indicam exploração, recompensa, interação social e maior motivação para (re)estabelecer contato social (BRUDZYNSKI, 2013; SIMOLA, 2015). O subtipo de USVs de 50 kHz *flat* pode ser o mecanismo de sinalização utilizado para alcançar tais comportamentos (BURGDORF et al., 2011). Ademais, a estimulação do sistema dopaminérgico ascendente do rato induz a ativação comportamental que desencadeia um aumento da atividade locomotora, da exploração e, conseqüentemente, um aumento do número de vocalizações de 50 kHz emitidas (BRUDZYNSKI, 2009). Para exemplificar essa relação, Mällo et al., (2007) relataram que ratos machos que apresentam níveis mais altos de exploração espontânea também apresentam níveis elevados de liberação de dopamina no tecido estriado. A anedonia, determinada pelo teste de preferência a sacarose, aqui carregada negativamente pode ser analisada em componentes motivacionais (perda de interesse) e hedônicos (perda de prazer). Imparidades no processamento de recompensa incluem incapacidade de experimentar prazer, falta de motivação para buscar uma recompensa, bem como déficits nos processos de aprendizado por reforço (HOFFMAN, 2016).

Nosso estudo apresenta algumas limitações que podem ter alterado o que esperávamos encontrar para nossos resultados. Primeiro, usamos animais de outro projeto com outro objetivo principal e, por consequência, isto pode ter prejudicado a



análise. Um segundo fator seria a inclusão de ratos submetidos à cirurgia estereotáxica, infusão de 6OHDA na SNc e administração sistêmica de roflumilaste. Entretanto, a análise prévia destes resultados não indicou diferença entre os grupos em nenhum dos comportamentos analisados (apêndice I). Mais ainda, se os comportamentos estivessem correlacionados, um fator (por exemplo a lesão na SNc) que influenciasse uma variável, também alteraria a variável correlacionado. Nesta linha, uma análise apenas com o subgrupo de ratos do grupo SHAM tratado com veículo apresentou os mesmos resultados. Finalmente, diferentemente de outros estudos que utilizaram USVs como preditores de comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso, não utilizamos um estímulo para eliciação das USVs (como estresse, cócegas ou indução por drogas) ou de comportamento tipo-depressivo ou tipo-ansioso (por exemplo: um protocolo de estresse repetido), para verificar as consequências no comportamento dos animais. Talvez, este fosse um fator importante para encontrar correlação entre as variáveis analisadas nos testes comportamentais realizados. Um problema adicional, reside no fato de existirem poucos estudos na literatura que mostram resultados negativos em relação às diferenças entre animais que apresentam alto e baixo índice de emissão de USVs de 50 kHz, o que dificultou a discussão de nossos resultados.

## **7 CONCLUSÃO**

Neste trabalho, as USVs espontâneas de 50 kHz não mostraram associação com os parâmetros emocionais analisados (ansiedade no LCE e depressão no TNF) em ratos Wistar macho. Portanto, estes resultados não apoiam o uso das USVs na predição de comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão. No entanto, podemos assumir que as USVs devem ser rotineiramente adicionadas à análise comportamental para acessar o estado geral dos ratos, uma vez que são úteis e não redundantes com outras variáveis comportamentais relacionadas ao estado afetivo dos ratos.

## REFERÊNCIAS

AHRENS, A.M., NOBILE, C.W., PAGE, L.E., MAIER, E.Y., DUVAUCHELLE, C.L., SCHALLERT, T. Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50-kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure.

**Psychopharmacology**, v. 229, n. 4, p. 687-700, 2013.

BRUDZYNSKI, S.M. Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 611-617, 2001.

BRUDZYNSKI, S.M., PNIAK, A. Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. **Journal of Comparative Psychology**, v. 116, n. 1, p. 73, 2002.

BRUDZYNSKI, S.M. Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine–dopamine interaction and acoustic coding.

**Behavioural brain research**, v. 182, n. 2, p. 261-273, 2007.

BRUDZYNSKI, S.M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **ILAR journal**, v. 50, n. 1, p. 43-50, 2009.

BRUDZYNSKI, S.M., IKU, A., HARNESS, A. Activity of cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus during emission of 22 kHz vocalization in rats.

**Behavioural brain research**, v. 225, n. 1, p. 276-283, 2011.

BRUDZYNSKI, S.M. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. **Current opinion in neurobiology**, v. 23, n. 3, p. 310-317, 2013.

BRUDZYNSKI, S.M. The ascending mesolimbic cholinergic system—a specific division of the reticular activating system involved in the initiation of negative emotional states. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 436-445, 2014.

BRUDZYNSKI, S.M. Pharmacology of ultrasonic vocalizations in adult rats: significance, call classification and neural substrate. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 180-192, 2015.

BRUDZYNSKI, S.M. (Ed.). **Handbook of Ultrasonic Vocalization: A Window into the Emotional Brain**. Academic Press, 2018.

BRUNELLI, S.A., CURLEY, J.P., GUDSNUK, K., CHAMPAGNE, F.A., MYERS, M.M., HOFER, M.A., WELCH, M.G. Variations in maternal behavior in rats selected for infant ultrasonic vocalization in isolation. **Hormones and behavior**, v. 75, p. 78-83, 2015.

BURGDORF, J., PANKSEPP, J., BRUDZYNSKI, S.M., KROES, R., MOSKAL, J.R. Breeding for 50-kHz positive affective vocalization in rats. **Behavior genetics**, v. 35, n. 1, p. 67-72, 2005.

BURGDORF, J., KROES, R.A., MOSKAL, J.R., PFAUS, J.G., BRUDZYNSKI, S.M., PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. **Journal of comparative psychology**, v. 122, n. 4, p. 357, 2008.

BURGDORF, J., PANKSEPP, J., BRUDZYNSKI, S.M., BEINFELD, M.C., CROMWELL, H.C., KROES, R.A., MOSKAL, J.R. The effects of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 51, n. 1, p. 34-46, 2009.

BURGDORF, J., PANKSEPP, J., MOSKAL, J.R. Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 9, p. 1831-1836, 2011.

CHILD, D. The essentials of factor analysis. New York, NY: Continuum International Publishing Group. 3<sup>a</sup> ed. 2006.

COFFEY, K.R., MARX, R.G., NEUMAIER, J.F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 5, p. 859, 2019.

CRYAN, J.F., MARKOU, A., LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CRUZ, A.P. de M., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

DOREMUS, T.L., VARLINSKAYA, E.I., SPEAR, L.P. Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 570-577, 2006.

ENGELHARDT, K., SCHWARTING, R.K.W., WÖHR, M. Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50-kHz ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 1, p. 83-98, 2018.

FIGUEIREDO FILHO, D.B., SILVA JÚNIOR, J.A.. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. **Opinião pública**, v. 16, n. 1, p. 160-185, 2010.

GOULD, T. D., DAO, D. T., KOVACSICS, C. E. The open field test. In: Mood and anxiety related phenotypes in mice. **Humana Press**, Totowa, NJ, 2009.

HARRO, J. Animal models of depression: pros and cons. **Cell and tissue research**, p. 1-16, 2019.

HOFFMAN, K. L. What can animal models tell us about depressive disorders? *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*, 35–86, 2016.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

KOIV, K., METELITSA, M., VARES, M., TIITSAAR, K., RAUDKIVI, K., JAAKO, K., VULLA, K., SHIMMO, R., HARRO, J. Chronic variable stress prevents amphetamine-elicited 50-kHz calls in rats with low positive affectivity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 631-643, 2016.

KUMAR, V., BHAT, Z. Ali., KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 68, n. 2, p. 175-183, 2013.

LINO-DE-OLIVEIRA, C., DE LIMA, T.C.M., DE PÁDUA, A.C. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behavioural brain research**, v. 158, n. 2, p. 243-250, 2005.

LITVIN, Y., BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behavioural brain research**, v. 182, n. 2, p. 166-172, 2007.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural pharmacology**, v. 8, n. 6-7, p. 523-532, 1997.

MALLO, T., MATROV, D., HERM, L., KOIV, K., ELLER, M., RINKEN, A., HARRO, J. Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 1, p. 57-71, 2007.

MALLO, T., ALTTOA, A., KOIV, K., TONISSAAR, M., ELLER, M., HARRO, J. Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. **Behavioural brain research**, v. 177, n. 2, p. 269-281, 2007.

MALLO, T., MATROV, D., KOIV, K., HARRO, J. MÄLLO, T. et al. Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 963-974, 2009.

MULVIHILL, K.G., BRUDZYNSKI, S.M. Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. **Physiology & behavior**, v. 196, p. 200-207, 2018.

NATUSCH, C., SCHWARTING, R.K.W. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 3, p. 251-259, 2010.

NESTLER, E. J., HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161, 2010.

PANKSEPP, J. Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: Modeling primal human laughter in laboratory rats. **Behavioural brain research**, v. 182, n. 2, p. 231-244, 2007.

PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Burlington (MA). 2005

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, M., ANDREATINI, R., SCHWARTING, R.K., BRENES, J.C. Amphetamine - induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? **Psychopharmacology**, v. 231, n. 13, p. 2567-2577, 2014.

PETIT-DEMOULIERE, B., CHENU, F., BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245-255, 2005.

PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M.L. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730, 1977.

PRUT, L., BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RADHAKRISHNAN, A., GULIA, K.K. Categories of Wistar Rats Based on Anxiety Traits: A Study Using Factor and Cluster Method. **Annals of neurosciences**, v. 25, n. 4, p. 234-240, 2018.

RAO, R. M., SADANANDA, M. Strain-and context-based 50 kHz ultrasonic vocalizations and anxiety behaviour in the Wistar-Kyoto rat. **Journal of biosciences**, v. 40, n. 3, p. 561-570, 2015.

RODGERS, R.J., JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995.

RYGULA, R., PLUTA, H., POPIK, P. Laughing rats are optimistic. **PLoS One**, v. 7, n. 12, 2012.

SCHMIDT, Mathias V.; MÜLLER, Marianne B. Animal models of anxiety. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, n. 4, p. 369-374, 2006.

SCHWARTING, R.K., WÖHR, M. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 337–348, 2012.

SCHWARTING, R.K.W.; JEGAN, N., WÖHR, M. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. **Behavioural brain research**, v. 182, n. 2, p. 208-222, 2007.

SIMOLA, N. Rat ultrasonic vocalizations and behavioral neuropharmacology: from the screening of drugs to the study of disease. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 164-179, 2015.

SIMOLA, N., BRUDZYNSKI, S.M. Rat 50-kHz ultrasonic vocalizations as a tool in studying neurochemical mechanisms that regulate positive emotional states. **Journal of neuroscience methods**, v. 310, p. 33-44, 2018.

SIMOLA, N., GRANON, S. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. **Neuropharmacology**, v. 159, p. 107420, 2019.

THIEL, C.M., HUSTON, J.P., SCHWARTING, R.K.W. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. **Neuroscience**, v. 85, n. 4, p. 1253-1262, 1998.

VAN DER STAAY, F. Josef. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain research reviews**, v. 52, n. 1, p. 131-159, 2006.

VARES, M., METELITSA, M., KOIV, K., KALDMAE, M., LAUGUS, K., TIITSAAR, K., SHIMMO, R., HARRO, J. Chronic stress sensitizes amphetamine-elicited 50-kHz calls in the rat: Dependence on positive affective phenotype and effects of long-term fluoxetine pretreatment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 171, p. 10-19, 2018.

WALF, A.A., FRYE, C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 322, 2007.

WALSH, R.N., CUMMINS, R.A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANG, Q. et al. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 77, p. 99-109, 2017.

WENDLER, E., DE SOUZA, C.P., DORNELLAS, A.P.S., SANTOS, L.E., FERREIRA, S.T., GALDURÓZ, J.C.F., WOHR, M., SCHWARTING, R.K.W., ANDREATINI, R. Mania-like elevated mood in rats: Enhanced 50-kHz ultrasonic vocalizations after sleep deprivation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 88, p. 142-150, 2019.

WILLIAMS, B., ONSMAN, A., BROWN, T. Exploratory factor analysis: A five-step guide for novices. **Australasian Journal of Paramedicine**, v. 8, n. 3, 2010.

WILLUHN, A.T., WANAT, M.J., HART, S.A., HOLLON, N.G., PHILLIPS, P.E.N., SCHWARTING, R.K.W., WÖHR, M. Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 32, p. 10616-10623, 2014.

WÖHR, M., HOUX, B.B., SCHWARTING, R.K.W., SPRUIJT, B.M. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. **Physiology & behavior**, v. 93, n. 4-5, p. 766-776, 2008.

WÖHR, M., SCHWARTING, R.K.W. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety related behavior in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v.122, p. 310–330, 2008.

WÖHR, M., SCHWARTING, R.K.W. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell and tissue research**, v. 354, n. 1, p. 81-97, 2013.

WÖHR, M., RIPPBERGER, H., SCHWARTING, R.K., van GAALEN, M.M. Critical involvement of 5-HT<sub>2C</sub> receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 10, p. 1817-1829, 2015.

WÖHR, M., van GAALEN, M.M., SCHWARTING, R.K.W. Affective communication in rodents: serotonin and its modulating role in ultrasonic vocalizations. **Behavioural pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 506-521, 2015.

WÖHR, M. Ultrasonic communication in rats: appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations as social contact calls. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 72, n. 1, p. 14, 2018.

YONG, A.G., PEARCE, S. A beginner's guide to factor analysis: Focusing on exploratory factor analysis. *Tutorials in quantitative methods for psychology*, v. 9, n. 2, p. 79-94, 2013.

ZIMMERBERG, B., BRUNELLI, S.A., FLUTY, A.J., FRYE, C.A. Differences in affective behaviors and hippocampal allopregnanolone levels in adult rats of lines selectively bred for infantile vocalizations. **Behavioural brain research**, v. 159, n. 2, p. 301-311, 2005.



## APÊNDICE

### Dados do projeto “Avaliação do efeito do Roflumilaste em modelo animal de Doença de Parkinson”

#### Cirurgia

Os animais foram anestesiados com Equitesin (45,7 ml de água; 4,25 g de hidrato de cloral; 2,13 g de sulfato de magnésio; 11,5 ml de álcool; 0,972 g de tiopental e 42,8 ml de propilenoglicol – 0,3 mg/kg, i.p.) e, em seguida, foram posicionados no aparelho estereotático. Infusões bilaterais de 6OHDA (Sigma – 6 µg/µL, dissolvidas em líquido cefalorraquidiano + ácido ascórbico a 0,2%) foram realizadas de acordo com as seguintes coordenadas: anteroposterior (AP) – 5,0 mm do bregma; mediolateral (ML) ± 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV) – 8,0 mm do crânio (PAXINOS e WATSON, 2005). O fluxo de cada injeção foi controlado por uma bomba eletrônica (Harvard Apparatus, EUA) a uma taxa de 0,33 µL/min por 3 minutos. A agulha permaneceu por 2 minutos no local da injeção após a infusão para evitar refluxo. O mesmo procedimento foi realizado com animais SHAM, aos quais no entanto, o líquido cefalorraquidiano foi administrado.

#### Tratamento

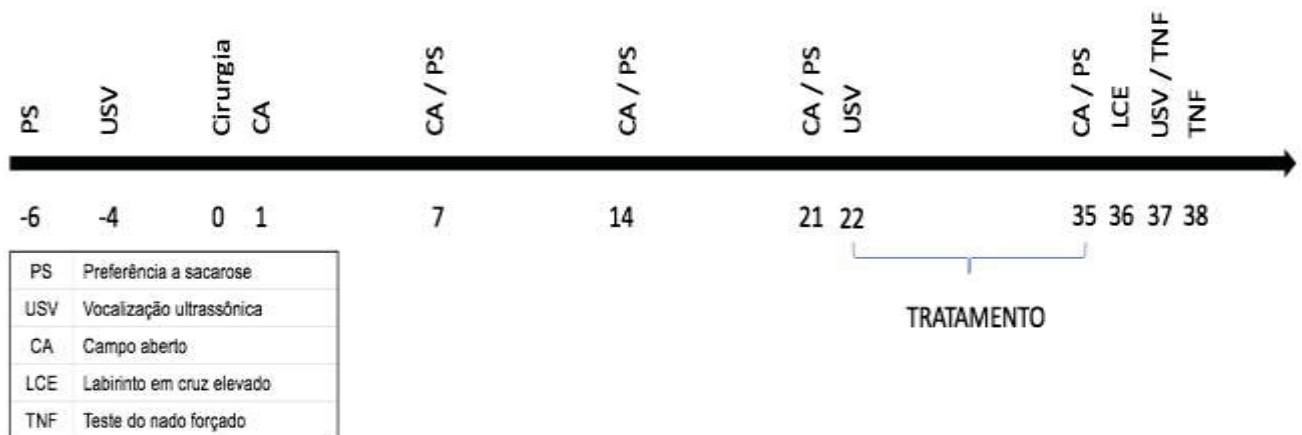
As fosfodiesterases (FDEs) são uma família de enzimas que hidrolisam cAMP e cGMP intracelulares. As FDEs estão recebendo atenção como possíveis alvos para o tratamento de vários distúrbios, incluindo doença de Alzheimer, déficits cognitivos, depressão, transtornos de ansiedade, esquizofrenia e doença de Parkinson, por estimular a neuroplasticidade e a neuroproteção, além de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Entre as várias isoformas das FDEs, a FDE4 emergiu como um alvo terapêutico de interesse. Os inibidores de FDE4 são reconhecidos por terem efeitos pró-cognitivos, neuroprotetores e anti-inflamatórios. Em 2011, o roflumilaste, um inibidor da FDE4, foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como um medicamento anti-inflamatório para o tratamento de exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica e foi o medicamento utilizado em nosso estudo.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: (i) SHAM + veículo; (ii) 6 OHDA + veículo; (iii) 6 OHDA + 0,01 mg/kg de roflumilaste e 6 OHDA + 0,1 mg/kg de roflumilaste. O veículo e o roflumilaste foram administrados por via intraperitoneal por



14 dias após a possível instalação de uma condição do tipo depressivo. Assim, os testes comportamentais foram realizados conforme mostrado na figura abaixo (figura 5).

**FIGURA 5 – LINHA DO TEMPO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DO PROJETO ENVOLVENDO A DOENÇA DE PARKINSON**

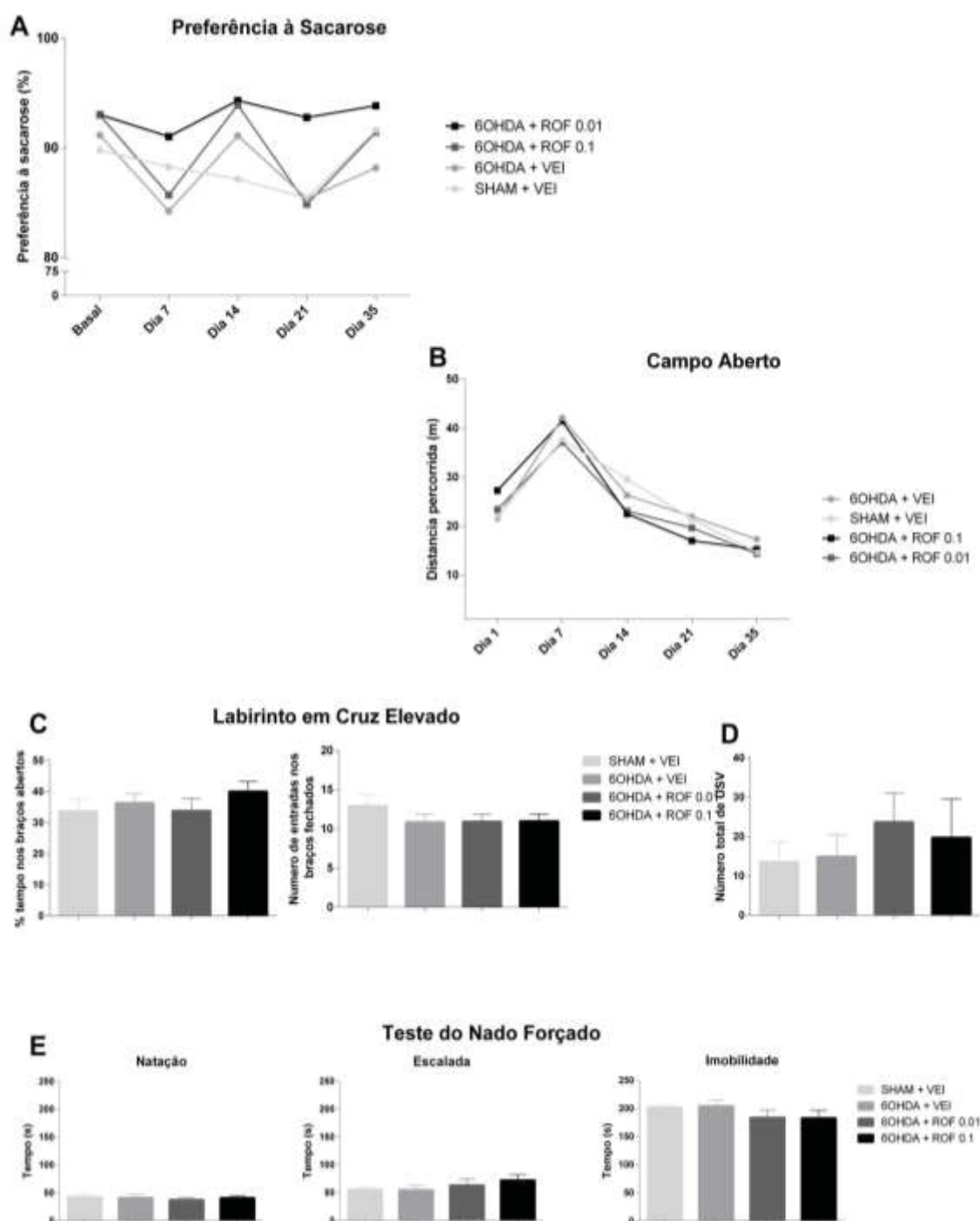


Fonte: o autor (2020).

## Resultados

A figura (figura 6) abaixo mostra os resultados obtidos na avaliação do efeito do roflumilaste em um modelo animal de doença de Parkinson. Comparando os resultados de todos os grupos, não houve diferenças significativas entre eles.

**FIGURA 6 – EFEITOS DO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM O INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 4 NOS TESTES COMPORTAMENTAIS EM RATOS**



Os grupos foram tratados com roflumilaste (0.1, ou 0.01 mg /kg, i.p.) ou veículo (i.p.). Os animais foram submetidos a cirurgia estereotóxica para infusão (6OHDA) ou não (SHAM) da neurotoxina. **(A)** Preferência à sacarose (%) foi avaliada semanalmente após a cirurgia (n= 11 – 14 animais/grupo); **(B)** Distância percorrida (m) no teste do CA medida semanalmente após a cirurgia (n= 14 – 17 animais/grupo); **(C)** % de tempos gasto nos BA e número de entradas nos BF do LCE no 36º dia após a cirurgia (n= 14 – 17 animais/grupo); **(D)** número total de USVs no 37º dia após a cirurgia (n= 12 – 14 animais/grupo); **(E)** tempo (s) nadando, escalando ou em imobilidade no TNF no 38º dia após a cirurgia (n= 14 – 17 animais/grupo). Dados estão expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma e duas vias foi utilizada.

## ANEXO

## Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 1219

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

## STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.047880/2018-47

**APROVADO/APPROVAL:** 30/10/2018 – R.O. 09/2018

**TÍTULO:** Avaliação do efeito do roflumilaste em modelo animal de Doença de Parkinson.

**TITLE:** Effect evaluation of roflumilast in animal model of Parkinson's disease.

**AUTORES/AUTHORS:** Roberto Andreatini, Maryana Albino Clavero, Camila Pasquini de Souza.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Farmacologia

  
Profª Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA